

哺乳類骨格筋における毛細血管分布について

—特に筋線維の代謝, 機能特性に関連して

奈良県立医科大学第2生理学教室

森 本 委 利

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF CAPILLARITY IN MAMMALIAN SKELETAL MUSCLES —WITH SPECIAL REFERENCE TO METABOLIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF MUSCLE FIBRES

TOMOTOSHI MORIMOTO

Second Department of Physiology, Nara Medical University

Received September 19, 1995

Abstract: Frozen sections of skeletal muscles were histochemically stained for capillaries by an amylase-PAS procedure and for histochemical typing of muscle fibres by a myofibrillar ATPase method in autopsy samples from 9 mammalian species: Norway rat, squirrel monkey, racoon dog, nutria, blackbuck, red kangaroo, western grey kangaroo, California sea lion and western lowland gorilla. Using a computer-aided image-analysing procedure the capillarities of the muscles were analysed by means of the "capillary domain area (CDA)", muscular cross area diffusionally governed by one capillary, and the Kroghian radius (R_K) computed therefrom. Myoglobin contents (Mb) of the muscles were spectrophotometrically determined. As for the CDA (R_K) we found evident species difference, muscle difference in any one species, and also regional difference in any one muscle, the facts suggesting that the capillarity might reflect functional and metabolic characteristics of muscles. We found also that the capillarity was highly correlated with muscle fibre cross area (FA) and Mb, and less and reciprocally correlated with oxidative muscle fibre contents in the muscle. California sea lion, a long-diving mammal, was quite different from the other 8 terrestrial species in that it exhibited much higher Mb and much poorer capillary supply. All these special characters could be reasonably understood in view of its diving behavior, in which, during diving, the blood supply to the muscles is almost completely cut off and the metabolic property swings rapidly from oxidative to glycolytic.

Index Terms

capillary, skeletal muscle, mammal, diffusion, diving

緒 言

末梢組織に対する O_2 供給は, 毛細血管内血液と細胞内 (厳密にはミトコンドリアレベル) との間の, PO_2 勾配に依存する拡散によって行われる。この拡散過程の rate を

規定する要因は多々あるが, もっとも基本的な要因として第一に組織における毛細血管密度, 換言すれば拡散距離をあげなければならない。組織におけるガス拡散をはじめて理論的に解析した Krogh-Erlang 円柱モデル^{1,2)}における円柱半径がこれに対応することはいうまでもない。

従来、組織 O_2 拡散の問題は、主として骨格筋を対象として研究されてきたが、機能的にも形態学的にも本来不均一系である筋を、単純化、理想化された上記モデルをもって解析することには多くの困難がともなう。

そこで、この不均一系を成す筋の毛細血管分布をより合理的に解析するため、現在まで多くの方法や考えが提出され、多数の研究が報告されている³⁻⁷⁾。

近年、Turek らは筋毛細血管の不均等分布を考慮に入れた morphometric な解析法を開発、心筋に応用し、その有効性を比較しているが⁸⁾、この中で、コンピューターを用いた省力的方法として、いわゆる Closest-Individual 法(CI 法)⁹⁾と、Capillary Domain 法(DO 法)¹⁰⁾について記載している。両法は共に心筋の毛細血管分布解析に有用であったが、その後さらに Egginton ら¹¹⁾により骨格筋を対象としてより詳細に検討された。その結果、DO 法がより当該解析に適していること、かつ直接的で、より短時間に解析できることが結論された。

哺乳類の骨格筋は通常、機能特性や代謝特性の異なる複数の筋線維タイプから成る不均質系である。種や筋が異なれば、あるいは、同じ筋でも部位が異なれば、このような筋線維組成パターンにも大きな差がみられ¹²⁻¹⁷⁾、これを反映して血管分布密度にも差が生じると考えられる^{5,18-20)}。

そこで今回、毛細血管分布が、骨格筋を構成する筋線維の諸特性とどのように関連するかを、9 種類 9 個体の哺乳動物を用いて、DO 法により解析、検討した。

材 料 と 方 法

供試筋

骨格筋は、以下 6 目 9 種の動物園飼育哺乳類(9 個体)から採取した。すなわち、有袋目 *Marsupialia* のアカカンガルー *Macropus rufus* オス 1 頭(以下 RK: 体重 36.0 kg)、ニシロカンガルー *Macropus fuliginosus* オス 1 頭(WGK: 体重 57.4 kg)、霊長目 *Primates* のリスザル *Saimiri sciureus* オス 1 頭(SM: 体重 0.97 kg)、ニシローランドゴリラ *Gorilla gorilla gorilla* メス 1 頭(GO: 体重 113.3 kg)、齧歯目 *Rodentia* のドブネズミ *Rattus norvegicus* メス 1 頭(R: 体重 0.15 kg)、ヌートリア *Myocaster coypu* メス 1 頭(NT: 体重 3.4 kg)、偶蹄目 *Artiodactyla* のブラックバック *Antilope cervicapra* オス 1 頭(BB: 体重 27.5 kg)、食肉目 *Carnivora* のホンダタヌキ *Nyctereutes procyonoides viverrinus* メス 1 頭(RD: 体重 3.3 kg)、潜水哺乳類である鰭脚目 *Pinipedia* のカリフォルニアアシカ *Zalophus californianus californianus* メス 1 頭(SL: 体重 91.5 kg)で、

各個体の左体側から採取した。各動物の年齢については、ブラックバック(10 ヶ月齢)ならびにアカカンガルーが亜成獣であるほかは、すべて成獣であった。

各供試動物は、ヌートリアにやや剖腹が認められたほかは全て栄養状態は良好で、その体格は生理的範囲内にあった²¹⁾。動物の死因は、ドブネズミ、ホンダタヌキ、リスザルは安楽死、ヌートリアは右下顎膿瘍、ブラックバックは左大腿骨折、アカカンガルーは化膿性腎炎、ニシロカンガルーは激突による延髄出血、アシカは外傷治療時の麻酔性ショック、ニシローランドゴリラは嘔吐物による窒息であった。各供試筋について、今回の諸測定結果に影響を及ぼすと思われるような疾患、病変等はみられなかった。

採取した筋は、横隔膜肋骨部 *diaphragma, pars costalis*(以下 DP)、長趾伸筋 *m. extensor digitorum longus*(EDL)、ヒラメ筋 *m. soleus*(SOL)、腓筋筋外側頭 *m. gastrocnemius, caput laterale*(GAS・L)、大腿二頭筋 *m. biceps femoris*(BF)、半膜様筋 *m. semimembranosus*(SM)、薄筋 *m. gracilis*(GR)、三角筋 *m. deltoideus*(DT)、大円筋 *m. teres major*(TM)、胸筋前部 *m. pectoralis, pars anterior*(PA)、上腕三頭筋外側頭 *m. triceps brachii, caput laterale*(TB・L)、前腕筋筋張筋 *m. tensor fasciae antebrachii*(TFA)および咬筋浅部 *m. masseter, pars superficialis*(MS)の 13 筋である。試料は、各筋の腹部から採取したが、場合により、骨から最も離れた部位の採取筋層を表層部(以下 S)、骨に最も近接の部位を深部(D)、表層部と深部との中間部域を中央部(M)とする 3 部域に等分割して、各部位から採取し試料とした。なお横隔膜肋骨部については、腱中心側腱と肋骨側腱の中間部を採取した。採取はまず全層にわたって採取、標本化し、さらに場合により顕微鏡下に肺側層(L)、中間層(I)、腹側層(A)に分割測定した。

組織標本作製

各動物の死亡から遅くも 10 時間以内に、標本作製のため先に述べた採取部位から 2~4 mm 角の筋肉を手早く切り取り、凍結用包埋剤(AMES™ Tissue Tek O. T. C. Compound)を使用して、液体窒素で冷却したイソペンタン内(-160℃)で急速に凍結包埋した。また同時に、ミオグロビン(以下 Mb)含量測定用として、約 4 mm 角の筋肉試料を採取、二重にアルミホイルで包み、液体窒素中で急速に凍結した。これらの試料は共に密閉ポリエチレン容器に入れ、-80℃下で使用まで保存した。試料はクリオスタット(Bright 社, FS/FCS)を用い、-20℃で筋線維走行に対し直角方向で 10 μm 厚の連続切片を作成、スライドガラスに貼付後、その 1 枚は Amylase-

PAS 染色法³⁾により筋肉毛細血管を染め出し(Fig. 1), 別の1枚は Brooke and Kaiser 法¹³⁾及び Nemeth and Pette 法²²⁾による mATPase 染色を一部改変して, 筋線維を I (SO)型, IIA(FOG)型, IIB(FG)型にタイプ分けした(Fig. 2). タイプ分けは, 各筋線維タイプ間で,

mATPase isoform の pH 感受性に微少な差があることに依拠している, とされている.

mATPase 染色は次の通り実施した: 各動物種により上記 pH 感受性に微妙な差があるため, まず各種について, 新鮮筋凍結切片を用いて染色の pH 特性を決定した.

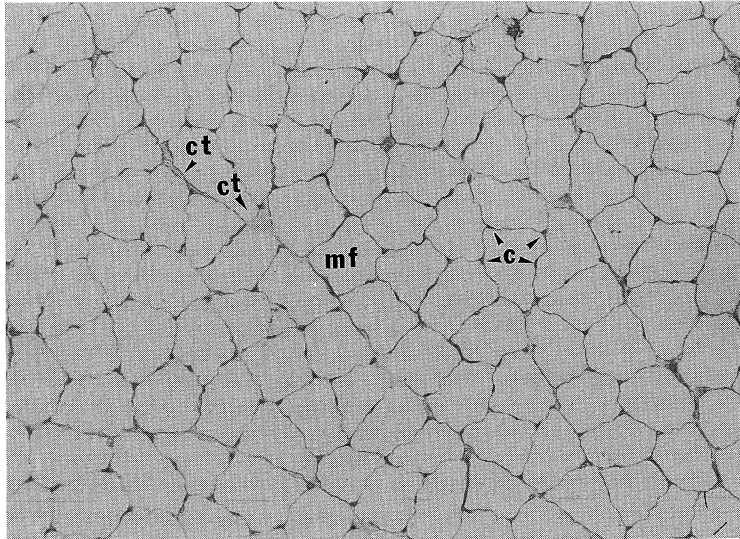


Fig. 1. Histochemical demonstration of capillaries in cross-sectioned soleus muscle (superficial region) of red kangaroo. Amylase-PAS stain ($\times 200$). c: capillaries, mf: cross-section of muscle fibre, ct: connective tissue.

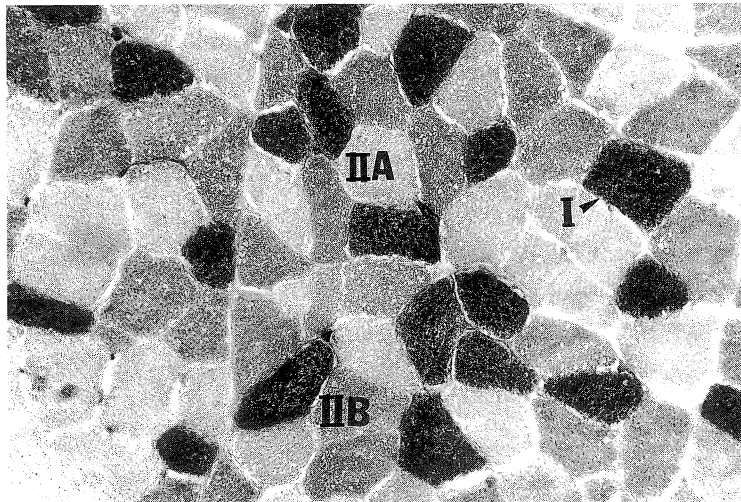


Fig. 2. Histochemical typing of mammalian muscle fibres by a myofibrillar ATPase stain method (Brooke and Kaiser¹³⁾). *M. tensor fasciae antebrachii* (superficial region) of California sea lion. Three fibre types, I, IIA and IIB, were differentiated.

Table 1. Morphometric analysis of capillarity and histochemical and biochemical characterization of skeletal muscles in mammals

Animals	Body Weight (kg)	Muscles	*	Capillary Domain Area (CDA) (μm^2)	Kroghian Radius (R_k) (μm)	Muscle Fibre Cross Area (FA) (μm^2)	[Mb] (mg/g)	Fibre Types (%)		
								I	IIA	IIB I + IIA
Norway Rat (R) ♀	0.15	DP	(W)	948.8±376.1 (347)	17.1±3.3 (347)	1600.3±729.3 (380)	3.5	42.8	38.7	18.5 81.5 (201)
		EDL	(M)	1376.3±472.6 (504)	20.6±3.5 (504)	2358.6±931.1 (405)	2.9	5.8	25.9	68.3 31.7 (404)
		SOL	(M)	1797.7±683.8 (179)	23.5±4.5 (179)	3714.7±1380.6 (224)	3.1	100.0		100.0 (270)
		GAS•L	(S)	1339.1±492.9 (447)	20.3±3.8 (447)	2691.0±873.5 (336)	2.1	32.2	26.4	41.5 58.5 (276)
		BF	(D)	995.9±424.0 (489)	17.4±3.6 (489)	1397.0±668.1 (648)	2.3	10.4	86.3	3.3 96.7 (299)
Squirrel Monkey (SM) ♂	0.97	SM	(M)	1969.8±869.8 (207)	24.5±5.3 (207)	2677.6±1018.4 (317)	2.4	9.6	58.7	31.8 68.2 (317)
		DP	(W)	1107.9±487.8 (475)	18.4±3.9 (475)	1660.3±685.5 (515)	5.9 (5)			
		EDL	(M)	1588.8±679.4 (288)	22.0±4.6 (288)	2511.8±777.8 (350)	4.8 (5)			
		SOL	(M)	1173.8±474.1 (496)	19.0±3.6 (496)	2993.4±728.7 (309)	7.2 (5)			
Raccoon Dog (RD) ♀	3.3	DP	(L)	1409.0±599.6 (224)	20.7±4.3 (224)	1872.5±917.8 (421)		41.8	56.8	1.4 98.6 (553)
		DP	(I)	975.4±417.1 (412)	17.3±3.6 (412)	1909.0±1031.3 (337)		41.2	58.8	100.0 (577)
		DP	(A)	1024.1±429.9 (368)	17.7±3.5 (368)	1461.6±587.2 (549)		42.7	55.8	1.5 98.5 (832)
		DP	(W)	1089.9±498.6 (1004)	18.2±4.0 (1004)	1709.3±856.6 (1307)	4.2 (5)	41.9	57.2	1.0 99.1 (1962)
		EDL	(S)	922.2±310.1 (629)	16.9±2.8 (629)	1876.1±444.8 (504)	3.6 (4)	18.0	79.2	2.8 97.2 (692)
		EDL	(M)	1038.7±364.2 (612)	17.9±3.1 (612)	2248.5±518.9 (363)	3.1 (4)	19.3	80.7	100.0 (388)
		GAS•L	(S)	1424.4±499.4 (396)	21.0±3.6 (396)	2381.7±559.0 (388)	3.3 (3)	22.8	74.2	3.0 97.0 (577)
		GAS•L	(M)	1188.6±441.6 (458)	19.1±3.5 (458)	2156.0±540.8 (365)	3.5 (4)	25.6	71.0	3.4 96.6 (245)
		BF	(S)	1258.4±465.7 (486)	19.7±3.5 (486)	1888.8±985.0 (519)	3.2 (2)	35.4	63.8	0.7 99.3 (302)
		BF	(M)	1005.0±333.6 (651)	17.7±2.8 (651)	2019.7±739.6 (482)	3.0 (4)	43.2	56.4	0.4 99.6 (592)
		GR	(S)	1280.8±432.9 (414)	19.9±3.2 (414)	1723.3±712.8 (533)	3.0 (2)	21.6	77.6	0.9 99.1 (734)
		GR	(M)	1194.0±335.4 (554)	19.3±2.7 (554)	1758.4±749.0 (539)	3.4 (4)	38.4	61.2	0.4 99.6 (688)
Nutria (NT) ♀	3.4	DP	(W)	2089.0±908.9 (231)	25.2±5.6 (231)	3464.8±1305.5 (255)	5.5 (6)			
		EDL	(S)	1567.9±708.2 (362)	21.9±4.6 (362)	2402.9±790.0 (359)	4.3 (6)	22.6	76.6	0.8 99.2 (178)
		EDL	(M)	1438.1±594.7 (421)	21.0±4.3 (421)	2746.8±971.8 (338)	5.8 (6)	11.5	88.3	0.2 99.8 (312)
		SOL	(S)	1540.5±719.9 (414)	21.6±4.7 (414)	2606.8±803.6 (374)	7.0 (6)	14.8	83.8	1.4 98.6 (591)
		SOL	(M)	2547.9±901.0 (132)	28.1±4.9 (132)	6145.0±1480.5 (139)	6.6 (6)			
Blackbuck (BB) ♂	27.5	DP	(W)	658.5±243.2 (1390)	14.3±2.5 (1390)	1686.0±738.6 (598)	6.2 (5)	33.9	65.1	0.9 99.1 (688)
		EDL	(S)	830.8±334.5 (867)	15.9±3.2 (867)	2342.1±955.5 (410)	4.3 (5)	30.6	69.4	100.0 (413)
		EDL	(M)	1053.1±466.1 (686)	17.9±3.9 (686)	3387.8±1161.1 (281)		31.9	68.1	100.0 (369)
		SOL	(W)	1689.3±459.9 (347)	23.0±3.2 (347)	2475.7±524.8 (382)	3.6 (5)	100.0		100.0 (130)
		GAS•L	(S)	1533.1±629.2 (442)	21.6±4.5 (442)	3650.9±1254.0 (250)		6.0	94.0	100.0 (180)
Blackbuck (BB) ♂	27.5	GAS•L	(M)	1762.2±654.3 (313)	23.3±4.3 (313)	4358.7±1289.5 (191)		10.5	89.5	100.0 (146)

* : denote the muscle region. (W) : whole, (M) : middle, (S) : superficial, (D) : deep.
 Figures in parentheses are numbers of measurements. See text for further details.

Table 2. Morphometric analysis of capillarity and histochemical and biochemical characterization of skeletal muscles in mammals

Animals	Body Weight (kg)	Muscles	* (μm^2)	Capillary Domain Area (CDA) (μm^2)	Kroghian Radius (R_k) (μm)	Muscle Fibre Cross Area (FA) (μm^2)	[Mb] (mg/g)	Fibre Types (%)		
								I	II A	II B I + II A
Red Kangaroo (RK) ♂	36.0	DP	(L)	914.0 ± 352.0 (737)	16.8 ± 3.0 (737)	2189.2 ± 502.5 (396)	6.5 (5)	44.2	55.9	100.0 (241)
		EDL	(S)	1253.3 ± 461.9 (580)	19.6 ± 3.6 (580)	3421.8 ± 1013.3 (269)	4.5 (5)	16.7	46.5	63.2 (366)
		EDL	(M)	1323.8 ± 482.9 (569)	20.2 ± 3.7 (569)	4271.2 ± 1482.3 (222)	5.0 (5)	17.0	35.6	52.6 (313)
		SOL	(S)	1817.5 ± 625.8 (443)	23.7 ± 4.0 (443)	3362.0 ± 498.1 (300)	5.6 (5)	100.0		100.0 (242)
		SOL	(M)	2334.4 ± 763.0 (230)	26.9 ± 4.5 (230)	3316.2 ± 583.1 (287)	4.7 (5)	100.0		100.0 (416)
		GAS•L	(S)				7.5 (5)			
		GAS•L	(M)				8.0 (5)			
Western Grey kangaroo (WKG) ♂	57.4	DP	(L)	1277.7 ± 543.8 (599)	19.8 ± 4.1 (599)	3242.9 ± 1694.6 (287)	6.2 (5)	39.0	61.0	100.0 (116)
		EDL	(S)	1824.6 ± 711.7 (472)	23.7 ± 4.6 (472)	4361.4 ± 1214.6 (218)	3.8 (5)	9.7	90.3	100.0 (336)
		EDL	(M)	1736.9 ± 729.9 (470)	23.0 ± 4.8 (470)	4251.8 ± 1178.9 (218)	2.8 (6)	11.8	88.3	100.0 (160)
		SOL	(S)	2572.5 ± 1099.8 (255)	28.0 ± 6.0 (255)	4136.0 ± 1251.6 (219)	7.5 (6)	100.0		100.0 (248)
		SOL	(M)	2882.9 ± 1303.7 (264)	29.6 ± 6.6 (264)	7161.2 ± 2223.9 (125)	8.5 (5)	100.0		100.0 (112)
		GAS•L	(S)	1929.8 ± 749.6 (360)	24.3 ± 4.8 (360)	4957.2 ± 1507.6 (184)	8.2 (6)	24.8	75.2	100.0 (178)
		GAS•L	(M)				8.3 (5)			
California Sea Lion (SL) ♀	91.5	DP	(L)	1735.5 ± 698.6 (376)	23.0 ± 4.6 (376)	2042.4 ± 844.1 (506)	32.8 (4)	51.9	46.9	98.8 (442)
		DP	(I)	2224.2 ± 1058.8 (281)	26.0 ± 5.9 (281)	1828.4 ± 684.7 (577)	31.3 (4)	56.7	43.2	0.1 (743)
		DP	(A)	1763.9 ± 633.9 (298)	23.3 ± 4.2 (298)	1922.3 ± 776.7 (595)	29.0 (4)	58.7	41.2	0.1 (600)
		DP	(W)	1888.2 ± 832.6 (955)	24.0 ± 5.1 (955)	1926.2 ± 772.4 (1678)	31.0			
		EDL	(S)	2215.5 ± 792.7 (274)	26.2 ± 4.4 (274)	2585.3 ± 679.1 (387)	31.9 (4)	48.0	51.8	0.2 (333)
		EDL	(M)	2897.7 ± 1007.9 (167)	30.0 ± 4.9 (167)	2720.8 ± 720.4 (366)	34.5 (4)	45.4	52.9	1.7 (317)
		GAS•L	(S)	3749.2 ± 1319.4 (121)	34.1 ± 5.8 (121)	3390.9 ± 1130.6 (257)	33.2 (4)	49.9	50.1	100.0 (309)
		GAS•L	(M)					27.8	72.2	100.0 (256)
		BF	(W)	2713.1 ± 893.5 (195)	29.0 ± 4.8 (195)	2722.0 ± 1192.2 (278)	31.4 (4)	10.3	42.6	47.1 (326)
		TB•L	(S)	2626.2 ± 882.4 (208)	28.5 ± 4.9 (208)	2725.4 ± 729.7 (325)	32.6 (4)	37.1	54.0	8.9 (349)
		TB•L	(M)	2974.6 ± 1206.8 (164)	30.2 ± 5.8 (164)	4034.0 ± 1208.7 (223)	35.7 (4)	74.7	25.3	0.3 (167)
		TFA	(S)	3565.5 ± 1284.1 (162)	33.2 ± 5.8 (162)	3335.6 ± 1459.4 (279)	33.2 (4)	13.2	45.8	41.0 (304)
		TFA	(M)	4200.7 ± 1433.8 (108)	36.0 ± 6.2 (108)	4025.1 ± 1482.7 (204)		22.4	29.6	48.0 (248)
		DT	(S)	2633.1 ± 885.9 (241)	28.5 ± 4.8 (241)	2619.1 ± 1156.4 (364)	31.5 (4)	33.5	66.5	100.0 (377)
		DT	(M)	2922.1 ± 1119.1 (235)	29.9 ± 5.8 (235)	2938.9 ± 1364.1 (317)		62.8	37.2	100.0 (298)
		TM	(S)	1836.8 ± 622.9 (366)	23.8 ± 4.1 (366)	2440.9 ± 571.1 (320)	27.9 (4)	47.5	52.3	0.2 (376)
		TM	(M)	1635.3 ± 524.6 (416)	22.5 ± 3.6 (416)	2820.0 ± 633.1 (284)	30.6 (4)	76.1	23.9	100.0 (283)
		PA	(S)	3549.6 ± 1269.5 (154)	33.1 ± 5.9 (154)	3136.0 ± 1147.8 (339)	38.9 (4)	17.3	17.0	65.7 (260)
		PA	(M)	2728.4 ± 1127.6 (375)	28.9 ± 5.8 (375)	3910.6 ± 1710.3 (405)	33.6 (4)	42.1	40.4	17.5 (174)
		MS	(S)				9.4 (4)			
		MS	(M)				7.2 (4)			

Western	113.3	DP	(L)	1169.1±556.0	(613)	18.8±4.4	(613)	4464.7±2285.4	(206)	10.3	(4)	53.4	10.4	36.2	63.8	(254)
Lowland		DP	(1)	1507.8±581.5	(395)	21.5±4.2	(395)	4414.8±2080.3	(207)			56.7	22.5	20.9	79.1	(252)
Gorilla		DP	(A)	1560.1±672.2	(466)	21.8±4.7	(466)	5153.4±2444.1	(183)	8.5	(4)	49.1	20.7	30.3	69.7	(92)
(GO) ♀		DP	(W)	1383.5±628.2	(1474)	20.5±4.7	(1474)	4658.8±2287.8	(596)	9.4	(4)					
		EDL	(S)	4779.4±2764.6	(561)	37.9±9.4	(561)	7334.0±2611.1	(599)	9.9	(4)	30.8	25.5	43.7	56.3	(464)
		EDL	(M)	4229.4±1806.9	(680)	35.9±7.5	(680)	9752.9±3032.8	(410)	10.3	(4)	38.9	34.7	26.4	73.6	(269)
		EDL	(D)	4661.6±2503.9	(985)	37.6±8.5	(985)	10056.8±3143.5	(591)	10.5	(4)	29.5	29.9	40.6	59.4	(558)
		SOL	(S)	4795.5±1992.4	(811)	38.3±7.6	(811)	12959.7±5265.1	(452)	10.3	(4)	56.1	24.5	19.4	80.6	(407)
		SOL	(M)	6076.8±3156.9	(428)	42.8±9.9	(428)	15159.4±6765.2	(311)	10.5	(4)	59.5	16.4	24.1	75.9	(292)
		SOL	(D)	4635.6±1741.7	(334)	37.7±7.1	(334)	15464.1±6547.5	(128)	10.9	(4)	54.6	22.7	22.7	77.3	(119)
		GAS・L	(S)	4916.0±2011.7	(430)	38.8±7.6	(430)	7668.6±1595.5	(436)	8.7	(4)	12.5	31.7	55.8	44.2	(240)
		GAS・L	(M)	4641.2±1927.1	(408)	37.7±7.4	(408)	7001.0±1662.0	(425)	9.8	(4)	14.1	41.0	45.0	55.1	(299)
		GAS・L	(D)	5198.7±1945.8	(162)	40.0±7.2	(162)	7469.5±2108.3	(199)	10.5	(4)	9.5	25.2	65.3	34.7	(129)

cf. Table 1.

すなわち, pH 4.3 から 4.6 まで段階的に pH を 0.05 ずつ変えた 100 mM-KCl を含む 100 mM-acetate buffer を用い, 液温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で 7 分から 30 分間, 切片を前解置した²²⁾. ついで蒸留水で 30 秒間 1 回水洗後, 50 mM-glycine-3 mM-ATP-30 mM- CaCl_2 -50 mM-NaCl (pH 9.40) 中で, 15 分から 30 分間, 切片を解置した (37°C). さらに蒸留水で 30 秒づつ 2 回水洗後, 90 mM- CaCl_2 溶液内で 3 分間室温で解置し, さらに水洗せずに 150 mM- CoCl_2 溶液中で, 3 分間, 室温で解置した. その後, 蒸留水で 30 秒づつ 3 回水洗し, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 溶液内で室温下に 1 分間解置した. 2 分間の蒸留水による水洗後, 無水エタノールで脱水, キシレンで透徹, カナダバルサムにより封入した. 各筋線維タイプの存在比 (%) は, 顕微鏡下に重複のないようできるだけ離れた数視野を選び, 各タイプの筋線維数をカウントして求めた. カウントした筋線維の総数は, 最低でも 100 を下らぬよう留意した.

筋肉中 Mb 含量測定

Reynafarje の分光学的方法²³⁾に多少の改変を加えて測定した²⁴⁾. すなわち, 凍結筋試料を解凍後, 氷冷ガラス板上でハサミとレザーを用い細切, よく混合する. 予め風袋測定ずみの蓋つき microfuge に 10~30 mg の細切筋をとり, その重量 (Wg) を分析用電子天秤 (AND 社, ER-180) により測定する. 1 mM EDTA を含む 10 mM Na_2HPO_4 , 0.8 ml (CO 飽和, 氷冷) を加え, 氷冷下に Phycotron マイクロホモジナイザー (NITI-ON) を用いて均等化後, 高速遠沈 (0°C , 15,000 rpm) する. 遠沈上清を別の microfuge にとり, クロロフォルム 0.2 ml を加え, CO をフラッシュした後, 10 秒間激しく振盪する. 再度高速遠沈してえられる上清をマイクロセルにとり, エア・スペースを CO でフラッシュした後, dithionite 結晶数片を加えて転倒混和, 試料の澄明化をまって, 530-580 nm 域のスペクトルを自記分光光度計により描記した. 538 nm および 568 nm での吸光度 (それぞれ A_{538} , A_{568}) から, 筋 Mb 含量 (mg/g 生筋) は下式により算出される.

$$\frac{5.696(A_{538} - A_{568})}{W} (0.8 + 0.75W) \dots (1)$$

計測値の解析

Amylase-PAS 染色標本は, 倍率 25 倍 (ただし, ニシローランドゴリラの SOL 及び EDL は 10 倍, GAS・L は 13.2 倍) で顕微鏡写真を撮影し, さらにそれを 10 倍に拡大し印画紙に焼付けた. このように原標本の 100~250 倍に拡大した写真を用い, 毛細血管および筋鞘を手トレースした後, 当教室が開発したコンピュータプログラム (Enoki et al. : 未発表) により画像解析した. トレー

スから2枚の写しをとり、1枚はその筋横断面の毛細血管中央点をドットとして、各ドットの座標値をデジタイザー(GRAPHTEC digitizer KW 4300)を用いてコンピューター(NEC PC 9801 RA)に入力し、隣接する毛細血管を結ぶ線分の垂直2等分線によって囲まれた領域、すなわち各毛細血管の拡散支配領域(Capillary Domain)^{10,11)}を画像化し(Fig. 3), その面積(以下CDA)を算出した(Voronoi tessellation法)。また、CDAからKrogh 拡散円柱半径推定値(以下 R_K)を算出した²⁰⁾。この場合、毛細血管からの拡散に対しバリアーとなると考えられる結合組織や大血管を含む部域(Fig. 1)およびドメイン算出に十分な情報のえられないトレース周辺部は画像処理により、画像ならびに計算から削除した。

トレースのもう1枚は、筋線維断面積(以下FA)の算出に用いた。FAはトレースされている筋鞘輪郭上の任意点(ふつう10点ばかり)の座標値を上述のデジタイザーで入力し、上記のプログラムによりコンピューター計

算した。CDA, R_K , FA およびそれぞれの対数についてえられた結果は、任意の階級幅のヒストグラムとしてディスプレイ表示され、またその平均値、標準偏差、中央値を算出、プリンタによってこのデータを印刷記録した。

統計計算

測定したデータは、平均値(Mean)±標準偏差(SD)で示し(Tables 1 & 2), 統計処理ではこの平均値を用いた。

データの種差、筋差、部域差をみるため、二標本t検定(パラメトリック法)²⁵⁾を実施した。なお、データが等分散と見なせない場合、Welch 法の二標本t検定を実施した。

2変量の相関をみるため、Pearson の相関係数を算出した。相関の有意性検定は、確率計算を実施し、その算出値が自由度 $n-2$ のt分布に従うことを利用して行った²⁵⁾。回帰直線は、最小二乗法により求めた。なお、有意水準は $P<0.05$ とした。

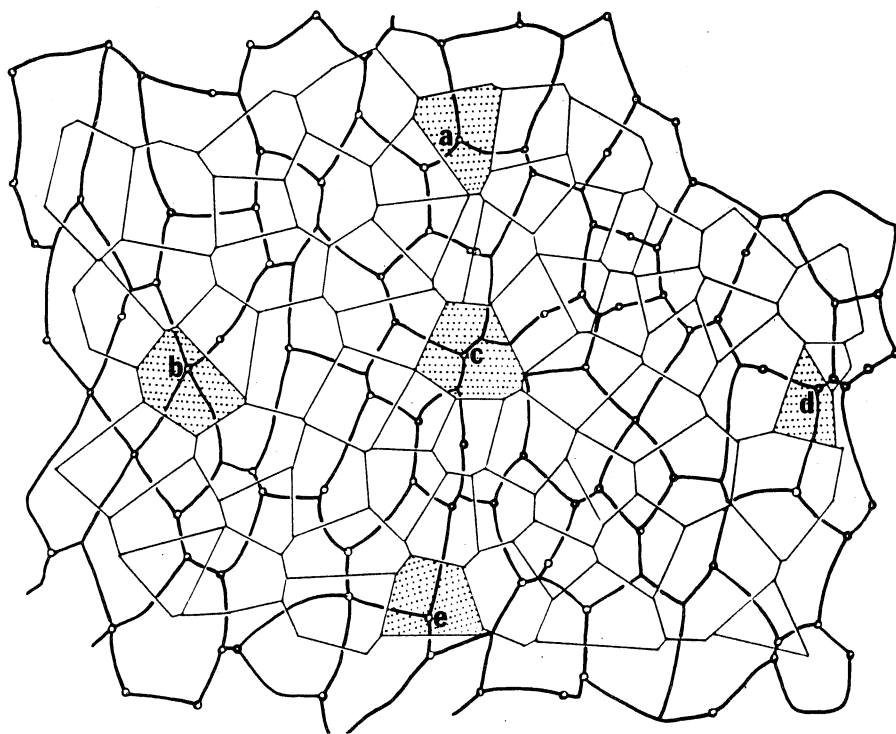


Fig. 3. Schematic representation of method for constructing the capillary domains. The capillary domain is the area surrounding each capillary (small open circles) by equidistant boundaries from the adjacent capillaries. Five stippled polygons, for example, are the capillary domains as for the capillaries a-e.

結 果

9種の哺乳動物についてえられた結果(CDA, R_K , FA, 筋Mb含量, 筋線維タイプ組成)をTable 1および2に総括した。また, 筋線維タイプ組成から, oxidative 筋線維(I + IIA)%も算出した。

骨格筋毛細血管分布(CDA, R_K)および筋線維サイズ(FA)の種差

全種間の比較が可能な4種類の筋(DP, EDL, SOL, GAS・L)について, ラットと他種との平均値を比較した。

DP(Tables 1 & 2): 相互の比較は筋全体(W)についてのデータに基づいて行ったが, アカカンガルーおよびニシクロカンガルーの場合は, 筋肺側層(L)の結果について行った。全9種の中で最大のCDA(したがって R_K)値を示したのはヌートリア(それぞれ2089.0 μm^2 , 25.2 μm)で, 最小値はブラックバックの658.5 μm^2 (14.3 μm)であった。ラット値と比較した場合, CDA,

R_K 両値ともアカカンガルーを除く全種において有意差を認めた($P < 0.001$)。また, FA値については, ゴリラで最大(4658.8 μm^2), ヌートリア(3464.8 μm^2)がこれに次ぎ, 最小は, ラット(1600.3 μm^2)で, リスザルおよびブラックバックを除く6種において, ラット値との間に有意差がみられた(ホンダタヌキ: $P < 0.02$, 他は $P < 0.001$)。

EDL(M)(Tables 1 & 2, Fig. 4): 9種中CDA, R_K の最大値を示したのはニシローランドゴリラで(4229.4 μm^2 , 35.9 μm), 最小値はホンダタヌキ(1038.7 μm^2 , 17.9 μm)およびブラックバック(1053.1 μm^2 , 17.9 μm)でみられた(Fig. 4)。ラット値との比較では, ヌートリアおよびアカカンガルーの2種を除き, 他の6種について, 明らかな差がみられた($P < 0.001$)。FAの最大値はゴリラ(9752.9 μm^2), 最小値はホンダタヌキ(2248.5 μm^2)で, いずれもラットとの間に有意差(リスザル, ホンダタヌキで $P < 0.05$, 他種で $P < 0.001$)がみられた(Fig. 4)。

SOL(Tables 1 & 2): ホンダタヌキおよびカリフォ

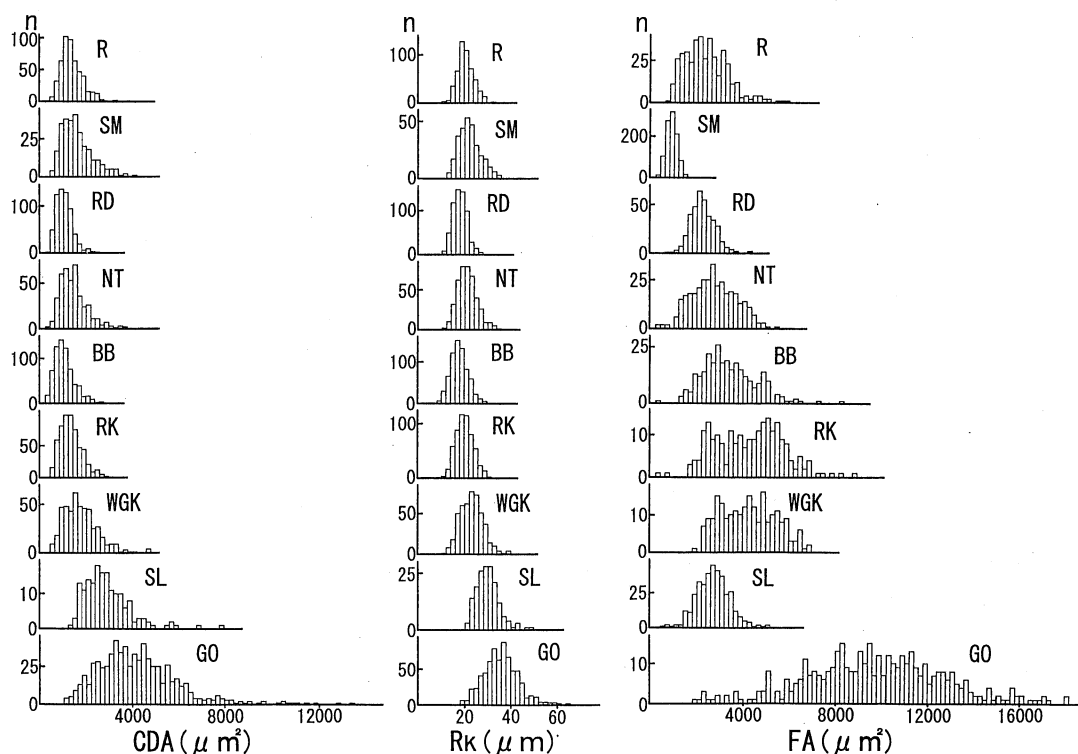


Fig. 4. Species differences of the capillary domain areas (CDA), Kroghian radii estimated therefrom (R_K) and muscle fibre cross area (FA) in *m. extensor digitorum longus* (middle region). Nine species (cf. Tables 1 and 2) were compared.

ルニアアシカを除く7種について筋中央部(M)に関し比較したが、ブラックバックの全層(W)の結果について比較した。CDA(R_k)の最大値はニシローランドゴリラの $6076.8 \mu\text{m}^2$ ($42.8 \mu\text{m}$) で、最小値はリスザルの $1173.8 \mu\text{m}^2$ ($19.0 \mu\text{m}$)、ブラックバックを除く全種において、ラット値との間に明らかな差がみられた ($P < 0.001$)。FA 値についてもゴリラで最大 ($15159.4 \mu\text{m}^2$)、ブラックバックで最小 ($2475.7 \mu\text{m}^2$) となり、ラットと比較して全種で有意差を認めた ($P < 0.001$)。ちなみに、イヌ²⁰同様、タヌキも先天的に SOL が欠損していた。

GAS・L(S)(Tables 1 & 2): リスザル、ヌートリア、アカカンガルーを除く6種について比較した。CDA(R_k)の最大値はゴリラの $4916.0 \mu\text{m}^2$ ($38.8 \mu\text{m}$) で、最小値はラットの $1339.1 \mu\text{m}^2$ ($20.3 \mu\text{m}$) となり、ラット値にくらべ全5種で有意差がみられた ($P < 0.001$, ただしホンドタヌキのみ $P < 0.02$)。FA 値の最大はゴリラの $7668.6 \mu\text{m}^2$ 、最小値はタヌキの $2381.7 \mu\text{m}^2$ で、ラット値との間には、全種について有意差をみた ($P < 0.001$)。

なお、今回検索した筋全体を通じて最大の平均CDA(R_k)値はニシローランドゴリラの SOL(M)で ($6076.8 \mu\text{m}^2$, $42.8 \mu\text{m}$)、最小値はブラックバックの DP(W)でみられた $658.5 \mu\text{m}^2$ ($14.3 \mu\text{m}$) であった。またFAの最大平均値は、ゴリラ SOL(D)での $15464.1 \mu\text{m}^2$ 、最小値

はラット BF(D)の $1397.0 \mu\text{m}^2$ であった。

骨格筋毛細血管分布(R_k)および筋線維サイズ(FA)の筋による差

各動物種それぞれについて、DP(W)(ただしアカカンガルーとニシクロカンガルーについてはDP(L)と他の筋を毛細血管分布(平均 R_k 値)およびFA平均値に関して比較した(Tables 1 & 2, Fig. 5)。

ラット: R_k についてみると、最小値はDP(W)の $17.1 \mu\text{m}$ 、最大値はSM(M)の $24.5 \mu\text{m}$ となり、DP(W)に比しBF(D)を除く4筋がいずれも有意差を示した ($P < 0.001$)。FAについては、BF(D)が最小の $1397.0 \mu\text{m}^2$ 、SOL(M)で最大の $3714.7 \mu\text{m}^2$ となり、DP(W)に比較すればいずれの5筋も有意差を示した ($P < 0.001$)。

リスザル: R_k についてはDP(W)で最小 ($18.4 \mu\text{m}$)、EDL(M)で最大 ($22.0 \mu\text{m}$) となり、DP(W)との比較では、他の2筋とも有意差を示した(EDLで $P < 0.001$, SOLで $P < 0.05$)。FA値はDP(W)で最小 ($1660.3 \mu\text{m}^2$)、SOL(M)で最大 ($2993.4 \mu\text{m}^2$)、DPと他の2筋間には有意差を認めた ($P < 0.001$)。

ホンドタヌキ: R_k はEDL(S)で最小 ($16.9 \mu\text{m}$)、GAS・L(S)で最大 ($21.0 \mu\text{m}$) となり、DP(W)に比し、EDL(M)を除く7筋で有意差をみた ($P < 0.001$, ただし、BF(M)のみ $P < 0.002$)。FAについては、DP(W)で最小

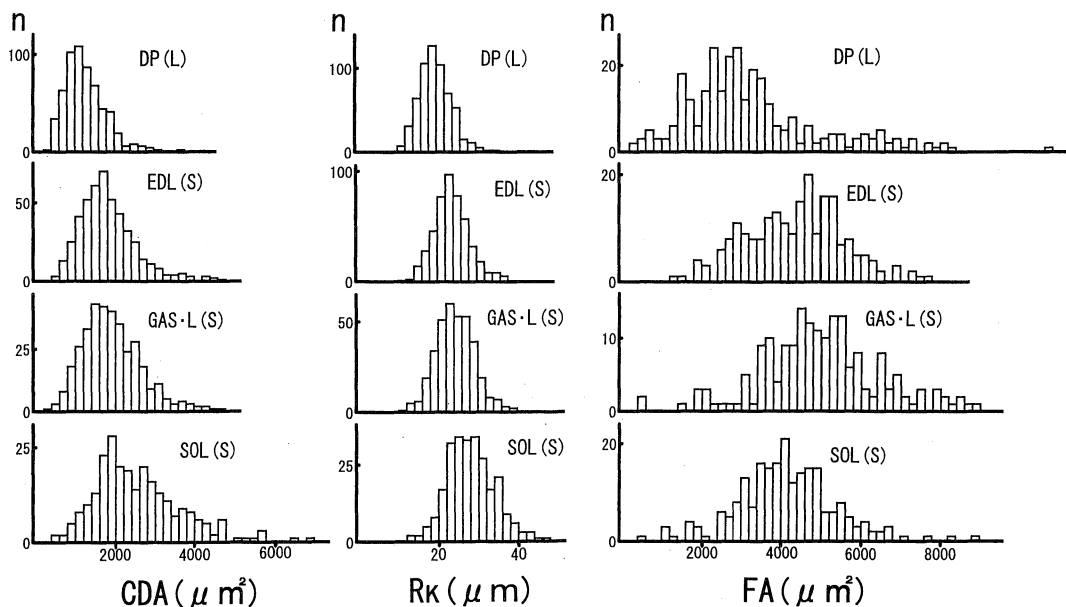


Fig. 5. Comparison of the capillary domain area (CDA), estimated Kroghian radii (R_k) and fibre cross area (FA) in four skeletal muscles of western grey kangaroo.

($1709.3 \mu\text{m}^2$), GAS・L(S)で最大($2381.7 \mu\text{m}^2$)となり, DP(W)との比較ではGR(S, M)を除く6筋で有意差をみた($P < 0.001$).

ヌートリア: R_k 最小値はEDL(M)の $21.0 \mu\text{m}$, 最大値はSOL(M)の $28.1 \mu\text{m}$ で, DPと他の4筋との間には, 明らかに有意差がみられた($P < 0.001$). またFAに関してはEDL(S), SOL(M)においておのおの最小値($2402.9 \mu\text{m}^2$), 最大値($6145.0 \mu\text{m}^2$)がみられ, DPと他筋との間にはいずれも有意差をみた($P < 0.001$).

ブラックバック: R_k の最小($14.3 \mu\text{m}$)ならびに最大値($23.3 \mu\text{m}$)は, それぞれDP(W)とGAS・L(M)においてみられ, DP値との比較では5筋の全てにおいて有意差をみた($P < 0.001$). FAについても, DP(W), GAS・L(M)において最小($1686.0 \mu\text{m}^2$), 最大値($4358.7 \mu\text{m}^2$)がみられ, DPと他筋間に有意差をみた($P < 0.001$).

アカカンガルー: R_k の最小, 最大値はそれぞれDP

(L)の $16.8 \mu\text{m}$, SOL(M)の $26.9 \mu\text{m}$ で, FAについてはDP(L)で最小($2189.2 \mu\text{m}^2$), EDL(M)で最大($4271.2 \mu\text{m}^2$)となった. DPと他の4筋の間には, R_k , FAとも有意差をみた($P < 0.001$).

ニシクロカンガルー: R_k の最小, 最大値はDP(L)の $19.8 \mu\text{m}$, SOL(M)の $29.6 \mu\text{m}$ で, FAについても, 同じく両筋で最小($3242.9 \mu\text{m}^2$), 最大値($7161.2 \mu\text{m}^2$)がみられた. R_k , FAともDPと他の5筋との間に有意差をみた($P < 0.001$).

カリフォルニアアシカ: 総計15筋についての解析結果から, R_k の最小, 最大値はそれぞれTM(M)の $22.5 \mu\text{m}$, TFA(M)の $36.0 \mu\text{m}$ となったが, FAについてはDP(W)で最小($1926.2 \mu\text{m}^2$), TB・L(M)で最大値($4034.0 \mu\text{m}^2$)を示した. なお R_k 値が最大であったTFA(M)でも, 実質的にはこれと変わらぬ大きなFA($4025.1 \mu\text{m}^2$)値がみられた. R_k 値については, TM(S)を除く13筋とDP(W)との間で明らかな差がみられたのに対し($P <$

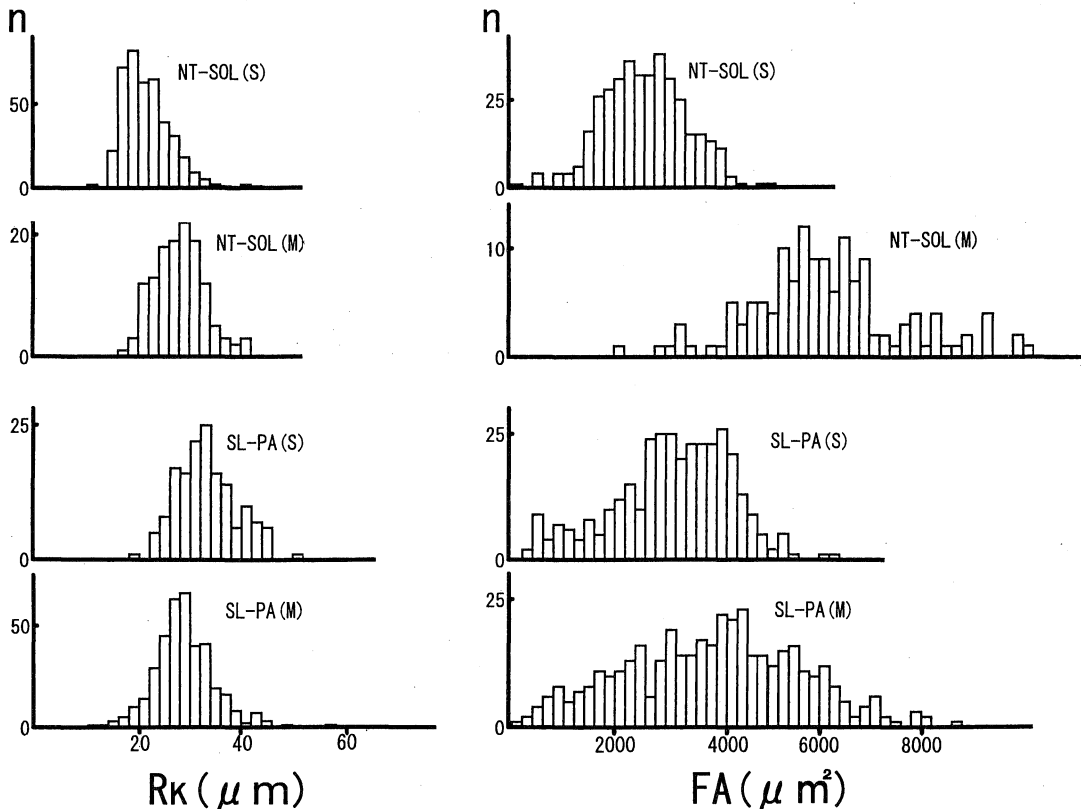


Fig. 6. Regional differences of the estimated Kroghian radii (R_k) and fibre cross area (FA) in soleus muscle (SOL) of nutria (NT) and pectoral muscle (PA) of California sea lion (SL). Superficial (S) and middle (M) regions were compared.

0.001), FA に関しては, DP(W)と他の全 14 筋との間に有意差を認めた($P < 0.001$).

ニシローランドゴリラ: 上でも述べたように R_K , FA と他種に比較して極めて大きな値を示すものが多かった。まず R_K についてみると, 最小値は DP(W)の $20.5 \mu\text{m}$ で, 他種の DP($14.3 \sim 25.2 \mu\text{m}$)に比して特に高値とはいえず, むしろヌートリアの $25.2 \mu\text{m}$, アシカの $24.0 \mu\text{m}$ を下まわる値であったのに対し, SOL(M)でみられた最大値($42.8 \mu\text{m}$)は他の 8 種と比較して著しく高い値であった。また, DP(W)と他の 9 筋の間には R_K 平均値に関し明らかな差がみられた($P < 0.001$)。一方, FA の最小, 最大値はそれぞれ DP(W)($4658.8 \mu\text{m}^2$), SOL(D)($15464.1 \mu\text{m}^2$)で, DP(W)と他筋間には全て有意差を認めた($P < 0.001$)。

同一筋内における毛細血管分布(R_K)および筋線維サイズ(FA)の部域差

7 種の動物(ヌートリア, ホンドタヌキ, ブラックバク, アカカンガルー, ニシクロカンガルー, カリフォルニアアシカ, ニシローランドゴリラ)につき, 若干の筋における筋内部域差をみた。以下, R_K および FA の同一筋内部域差について述べる(Tables 1 & 2, Fig. 6)。相互の比較にさいし, DP については DP(L)と, 他筋については, 各筋表層部(S)との差を検討した。

R_K では, アシカの DP(A), ゴリラの EDL(D), SOL(D)および GAS・L(D)を除くその他の筋全てにおいて有意の部域差を認めた($P < 0.001$ 。ただし, $P < 0.005$: タヌキの GR(M), ヌートリアの EDL(M), ニシクロカンガルーの EDL(M)と SOL(M), アシカの TB・L(M)と DT(M)。 $P < 0.02$: アカカンガルーの EDL(M)。 $P < 0.05$: ゴリラの GAS・L(M))。

FA については, タヌキの DP(I)と GR(M), アカカンガルーの SOL(M), ニシクロカンガルーの EDL(M), ゴリラの DP(A)と GAS・L(D)で有意差を認めなかった。しかし, その他の筋では全てにおいて有意差を認めた($P < 0.001$ 。ただし, $P < 0.002$: アシカの DT(M)。 $P < 0.01$: アシカの EDL(M)。 $P < 0.02$: タヌキの BF(M)とアシカの DP(A))。

毛細血管分布(R_K)と筋線維サイズ(FA)との関連(Fig. 7)

カリフォルニアアシカを除く 8 種についての結果から, R_K と FA 間に明らかな正相関のみられることがわかる($y = 15.42 + 0.00199x$, $r = 0.880$, $n = 54$, $P < 0.001$)。ローランドゴリラの場合, 直線回帰の結果($y = 20.82 + 0.00149x$, $r = 0.696$, $n = 12$, $P < 0.02$)は上記 8 種についての結果と実質上差違を示さぬものの, DP 以外の筋

についてのみ計算すれば傾きがほとんどゼロの回帰直線($y = 36.59 + 0.00019x$, $r = 0.327$, $n = 9$, 有意差無し)がえられ, 筋線維サイズとは関係なく一定の毛細血管分布を示すことがわかった。

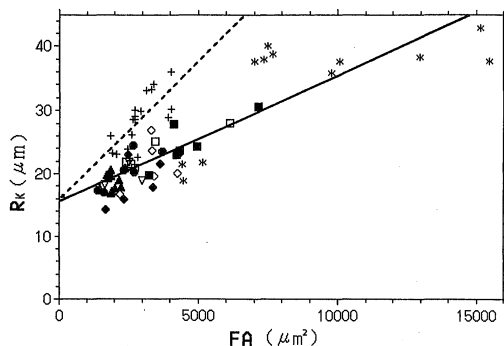


Fig. 7. The relationship between Kroghian radii (R_K) estimated from capillary domain area and fibre cross area (FA) in skeletal muscles of 9 mammalian species.

+; California sea lion, ●; Norway rat, ▽; squirrel monkey, ▲; racoon dog, □; nutria, ◆; blackbuck, ◇; red kangaroo, ■; western grey kangaroo, *; western lowland gorilla

$$y = 15.99 + 0.00436x \text{ (sea lion, } r = 0.728, n = 17, P < 0.001)$$

$$y = 15.42 + 0.00199x \text{ (8 species other than sea lion, } r = 0.880, n = 54, P < 0.001)$$

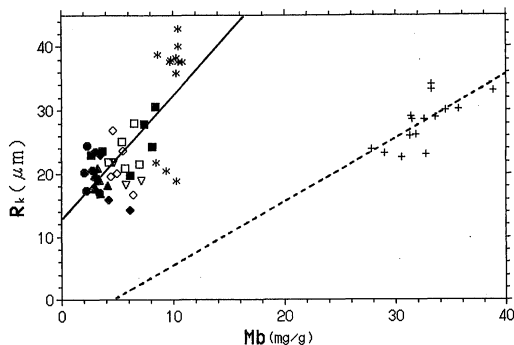


Fig. 8. The relationship between the estimated Kroghian radii (R_K) and myoglobin content (Mb) in skeletal muscles of 9 mammalian species. Symbols as in Fig. 7.

$$y = -4.76 + 1.007x \text{ (sea lion, } r = 0.701, n = 15, P < 0.005)$$

$$y = 12.57 + 1.967x \text{ (8 species other than sea lion, } r = 0.723, n = 49, P < 0.001)$$

一方、カリフォルニアアシカについてのデータは明らかに他の8種についての結果とは趣を異にし、直線回帰式も $y = 15.99 + 0.00436x$ ($r = 0.728$, $n = 17$, $P < 0.001$) となっており、傾きは他の8種についての場合の約2倍となった。

Mb 含量と毛細血管分布 (R_K) との関連 (Fig. 8)

カリフォルニアアシカの Mb 含量が極めて高いため、本種のみ分布が完全に独立したかたちとなった。カリフォルニアアシカ以外の種を1グループとみて計算すると、直線回帰式は、 $y = 12.57 + 1.967x$ ($r = 0.723$, $n = 49$, $P < 0.001$) となり明らかな正相関関係がみられた。

また、カリフォルニアアシカのみの分布は、直線回帰 $y = -4.76 + 1.007x$ ($r = 0.701$, $n = 15$, $P < 0.005$) とこれも高い正相関を示した。

Oxidative 筋線維 (I + II A) % と毛細血管分布 (R_K) との関連 (Fig. 9)

今回筋線維タイプ同定のできなかつたリスザルを除く8種について両者の相関をみたところ、直線回帰の結果 ($y = 39.82 - 0.171x$, $r = -0.486$, $n = 67$) から、両者間にはごく弱いながら逆相関 ($P < 0.001$) のあることがわかった。また同一種で比較的広い測定値分布のみられたカリフォルニアアシカの場合、 $y = 38.15 - 0.111x$ ($r = -0.598$, $n = 17$, $P < 0.005$) で、比較的高い相関がみられた。

FA/CDA 比 (FDR) と筋 Mb 含量 (Fig. 10)

FDR (Fibre/Domain Ratio) は、FA と CDA との比、したがって1個の筋線維を拡散支配する平均毛細血管数 (2次元的にとらえられた) を示す、と考えることができる。

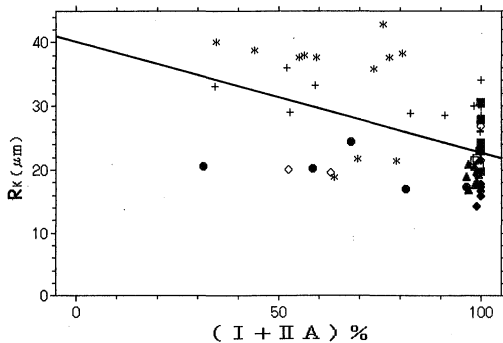


Fig. 9. The relationship between the estimated Kroghian radii (R_K) and oxidative (I + II A) fibre type % in skeletal muscles of 8 mammalian species. Symbols as in Fig. 7.
 $y = 39.82 - 0.171x$ ($r = -0.486$, $n = 67$, $P < 0.001$)

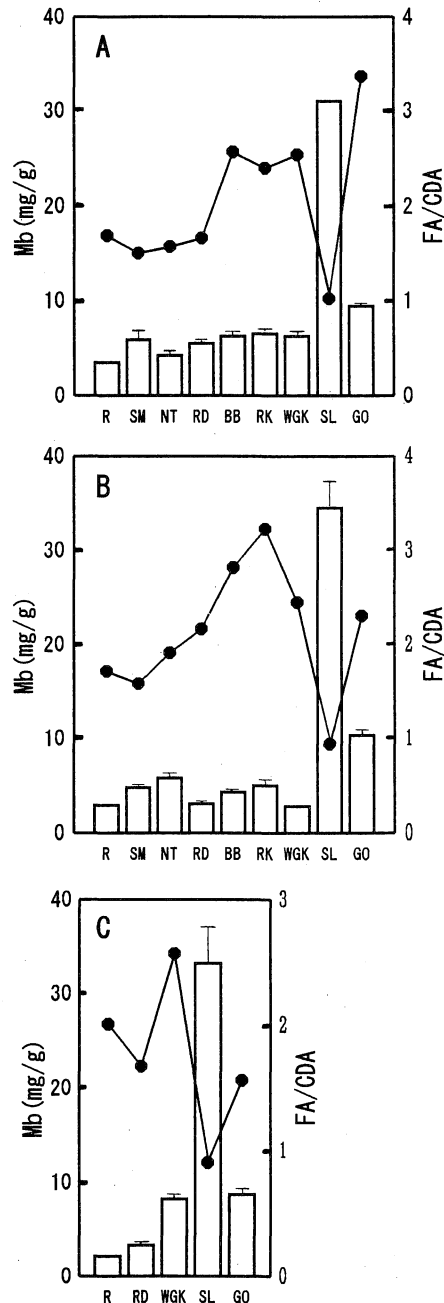


Fig. 10. Fibre/Domain ratios (solid circles) and myoglobin contents (open columns) in three skeletal muscles of 9 mammalian species. A: *Diaphragm*, B: *M. extensor digitorum longus* and C: *M. gastrocnemius* (lateral head). As for *gastrocnemius* the results of five animal species were presented.

Fig. 10 AにDP(W)(ただし、アカカンガルーおよびニシクロカンガルーではDP(L)), Fig. 11 BにEDL(M)(ただし、ブラックバックではEDL(S)), Fig. 10 CにはGAS・L(S)についてえられたFDRと筋Mb含量の結果を示した。3筋に共通してみられる顕著な結果として、1) カリフォルニアアシカを除く他種動物においては高いFDR値(DP: 2.16 ± 0.66 , EDL: 2.27 ± 0.55 , GAS・L: 1.95 ± 0.45)がみられるのに対し、アシカでは明らかに低いFDR値(DP: 1.02, EDL: 0.94, GAS・L: 0.90)がみられること、2) 一方、Mb含量に関しては、アシカにおいて極めて高い値(DP: 31.0 mg/g, EDL: 34.5 mg/g, GAS・L: 33.2 mg/g)がみられるのに対し、他種においてはこれをはるかに下まわる低値(DP: 5.9 ± 1.7 mg/g, EDL: 4.9 ± 2.4 mg/g, GAS・L: 5.6 ± 3.3 mg/g)のみみられることがあげられる。アシカにおけるこのような特殊性は、その潜水機能と密接に関連するものと考えられる。

なお、アシカの咬筋Mb含量が、他筋に比し著しく低い事実が注目される(Table 2)。おそらく、アシカにおいては捕食した餌がそのまま丸呑みされるため、咬筋が日常ほとんど働かないことによると考えられる。残念ながら咬筋においては筋線維走行が極めて不規則なため、今回、毛細血管分布、筋線維断面面積等についての組織化学的検索は行わなかった。機会をみてさらに検討したい。

考 察

組織毛細血管分布の定量的解析法について

1) Kroghモデルと R_K : 組織における毛細血管分布は、組織への O_2 その他基質の供給、組織からの代謝産物搬出を規定する基本的要因の一つで、したがって、当該組織の機能を規定する要因としても最も重要なものの一つである。このような観点から、組織における毛細血管分布に関する形態学的観察は、古くは17世紀、MalpighiやVan Leuwenhoekにはじまり多くの報告がある²⁷⁾。しかし、分布に関する定量的解析は、今世紀初頭、生理学者Kroghが数学者Erlangの協力を得て提出した組織拡散円柱モデル¹⁾を以て嚆矢とし、下式で示される。

$$\Delta P = P_c - P_x = \frac{\dot{M}O_2}{K} \left(\frac{R_K^2}{2} \ln \frac{x}{r} - \frac{x^2 - r^2}{4} \right) \dots \dots (2)$$

ただし、 P_c : 毛細血管血 PO_2 (torr), P_x : 毛細血管中心から外側 x に位置する組織内任意点における PO_2 (torr), $\dot{M}O_2$: 単位時間あたり毛細血管から組織への O_2 移行量で、定常状態下では組織 O_2 消費に等しい(ml O_2 /cm³組織/min), K : Kroghの拡散係数, R_K : いわゆる Krogh 円柱の半径, r : 毛細血管半径。すなわち、ある毛細血管

に関する拡散支配領域として、当該毛細血管を中心とする半径 R_K の組織円柱を想定することから、'Kroghの円柱モデル'と呼ばれる。Krogh-Erlang モデルは、組織におけるガス拡散をきわめて単純化して記載したもので、その後、その限界について多くの批判的評価(たとえば、いわゆる Kreuzer's list²⁸⁾)はあるものの、現在もおこの領域における研究の基本モデルとしての地位を保っている。

(2)式から明らかなように、Krogh半径(R_K)は組織におけるガス拡散を定量的に取り扱う場合の最も基本的なパラメーターの一つである。ところで、 R_K が組織における毛細血管分布(密度)によって規定されるのは自明のことであって、ここに毛細血管分布に関する定量的データの重要性がある。

2) 毛細血管分布の定量的指標: 従来、組織切片についてえられる組織学的データから、毛細血管分布を定量的に表現するため、いろいろな次元での指標が用いられてきた²⁷⁾。

0次元指標: 単純な毛細血管数で、ふつう単位組織断面面積あたりの毛細血管数として示される。また、筋の場合、同一筋断面での筋線維数との比(C/F比)として表現されることも多い⁹⁾。最も単純な指標としてよく報告されているが、本質的には拡散との関連で重要な情報はほとんど与えず、また、拡散に重要な関わりをもつ毛細血管分布の不均質性については何ら語るところがない^{27,29)}。

1次元指標: たとえば平均隣接毛細血管間距離(Intercapillary Distance, ICD)。算定にはClosest Individual法などが用いられる⁹⁾。当該指標は、組織での拡散と毛細血管分布との関連に関しても一定の情報をもたらすし、またこれと密接に関係する毛細血管分布パターン(不均質性)についての情報も与えるが、本来、ある毛細血管を中心とする拡散が1次元方向でのみおこるものでないことから、十分な指標とはいえない。

2次元指標: 今回用いたCapillary Domain^{10,20)}はこれにあたる。本来、組織内での拡散は3次元的现象であるが、Krogh-Erlangモデルは、これを2次元の断面において捉え解析している。また、解析の素材となる毛細血管分布も、組織切片からえられる2次元情報を基としている。その他、下述するように、当該指標には他の指標に比していくつかの優れた点がみられ、今回、解析手法としてこれを用いた。

3次元指標: 拡散が3次元の事象であること、また、Kroghモデルの前提の一つである'毛細血管と筋線維の平行関係'が現実には必ずしも成立しない場合もあるこ

と(tortuosity)^{7,30)}からみて、3次元指標が究極的に望ましいことは言うまでもない。現在、いわゆる Stereology 手法を用いれば当該指標を得るのもさして難事ではないと思われるが、これまでのところこの種の報告はほとんどなされていない³¹⁾。

3) Capillary Domain について： 当該指標を最初に用いたのは Hoofd ら(1985)¹⁰⁾で、その後 Egginton 一派による更なる発展が報告されている²⁰⁾。この指標の利点としては、

(1) 拡散に関する2次元情報を与える： 組織断面は、各毛細血管を中心とした多角形(Capillary Domain)によって、隙間なくかつ重複なしに被われ(Fig. 3), その面積(CDA)から R_K 推定値が算出できる。

$$R_K = \sqrt{CDA/\pi} \cdots \cdots (3)$$

(2) CDA ないし R_K に関する SD 値(LogSD 値)から、毛細血管分布の不均質性に関する情報がえられる： Hoofd らによれば¹⁰⁾、CDA(R_K)よりは、その対数の分布がより正規分布に近いとのことであるが、今回の測定値について適合をこころみたと必ずしもそうとは言えない結果がえられた。(3) CDA(R_K)値から、1次元指標である ICD の推定値がえられる。すなわち、

$$ICD = 2 R_K = 2\sqrt{CDA/\pi} \cdots \cdots (4)$$

いうまでもなく、Voronoi tessellation 法による計算は、各隣接毛細血管を中心とする拡散相互間で、 ΔP_{O_2} (したがって拡散速度)に差がないという前提に立っている。この前提を裏付ける信頼すべき実験データは現在ないが、筋細胞内 Mb の O_2 飽和度から推定した細胞内 P_{O_2} が比較的均一であるという事実³²⁾は、不完全ながらこれを支持する根拠となりえよう。

哺乳類骨格筋における毛細血管分布

従来、主として上述0次元指標による解析から、いわゆる赤筋(oxidative)における毛細血管密度は白筋(glycolytic)におけるよりも高いとされてきた。典型的な結果として、前者における C/F 比=2 に対し、後者では1という値⁹⁾が、よく引用されている。このことは、代謝様式が oxidative な(したがって、 $\dot{V}O_2$ の高い) I (SO), IIA(FOG)線維を多く含む赤筋においては、 O_2 をもたらす通路となる毛細血管の密度も当然高い、ということによって広く一般に承認されてきた。

しかし、上記の結果は、比較的限られた動物種について、かつ、毛細血管分布の指標として必ずしも優れているとは言えない指標に依拠したものであって、なお、再検討の余地があると言わざるを得ない。今回の検討は、とくに如上の点に留意して企画した。すなわち、動物種

としては、サイズ的大幅に異なる(0.15 から 113.3 kg)6 目9種を選定し、それぞれについて機能～代謝特性のちがう数種の筋を材料としただけでなく、筋によっては同一筋内の異なる部域間での比較を試みた。また、解析の方法としては、現時点で最も優れていると思われる Capillary Domain 法^{10,20)}を用いた。

その結果、少なくとも4種の筋(DP, EDL, SOL, GAS・L)については、ごく僅かな例外を除き、毛細血管分布に関して明らかに種差のあること、また各種を通じ、各筋間でも明らかに毛細血管分布差のみられること、さらに観察例はさほど多くはないが、同一筋内の部域によっても、毛細血管分布に差のみられること等がわかった(Fig. 4-6)。これら一連の結果は、今後さらに、これら筋の構成筋線維の形態学的特徴、代謝～機能特性についての精査を要するとは言え、各筋の特徴を反映して毛細血管分布にも差の生じることを示したものといえる。

そこで、毛細血管分布がどのような要因によって規定されるのかをうかがう目的で、 R_K と今回測定した構成筋線維特性若干との相関を検討した(Fig. 7-10)。

その結果、毛細血管分布(R_K)と筋線維サイズ(FA)、ミオグロビン含量(Mb)との間にはかなり強い正相関が、また oxidative な筋線維%との間には弱い逆相関のみられることがわかった。最近、Egginton ら²⁹⁾が、Capillary Domain 法による解析結果に基づき述べているところによれば、筋における毛細血管分布を規定する第一義的因子は、筋線維のサイズであって、従来最重要と考えられてきた筋線維の代謝特性($\dot{V}O_2$)には、むしろ第2義的な重要性しかない、という。筋において毛細血管が筋線維外(筋線維間腔)に原則として局在することから考えれば、この結論は当然の結論であって、今回の結果は、さらに多くの動物種と筋についてこれを確認したと結論することができる。ただし一般論として、oxidative な筋線維タイプ(I および IIA)の筋線維サイズが glycolytic な筋線維(II B)に比し、かなり小さいという事実³³⁾のあることから、 R_K —FA 間にみられる正相関関係にはこのような形で筋線維の代謝特性が反映されている可能性も否定できない。(I + IIA)% と R_K との間にみられる逆相関関係(Fig. 9)はこのような観点から理解することが可能であるが、いずれにせよ、その寄与の程度は極めて弱いと言わざるをえない($r = -0.486$)。 R_K と Mb との間にみられる正相関関係についても、同様の観点から論ずることができよう。すなわち、従来から oxidative な筋線維タイプ(I, IIA)においては、一般に高い Mb 含量がみられ³³⁾、このことがこれら筋線維タイプにおける“oxidative な代謝特性—低出力・長期にわたる遅い収縮”と何らかの関

連を持つとされている。今回、Fig. 8にみた結果は、高 Mb 筋ほど高 R_K 値(低毛細血管密度)を示し、線維の代謝特性が少なくとも当該筋の毛細血管分布の第一義的規定因子でないことを示唆している。

潜水性哺乳類骨格筋の特殊性

今回検討の対象とした9種の哺乳類のうち、カリフォルニアアシカは他の8種に比し、際だった特異性を示した(Fig. 4, 7-9)。Fig. 10はこの特異性をさらに端的に示している。まず、他の8種(ごく短時間潜水可能なヌートリアを除き、全て陸生)とは異なり、長時間かつ170 mの深さまで潜水することのできるカリフォルニアアシカ(good diver)³⁴⁾では、他の潜水性動物で既に報告されているように³⁵⁾きわめて高い Mb 含量が、咬筋以外の骨格筋でみられた(Table 2)。さらに、今回新たに得られた新知見として、アシカにおける FDR 値が他種における値の約1/2、換言すれば、筋線維を拡散支配する毛細血管密度が極めて低い事実が注目される。他種の数倍に及ぶ Mb 含量は、呼吸停止下の潜水時における O_2 store を増すという利点をもたらすことは言うまでもない³⁶⁾。一方、潜水時にみられる著明な循環性変化として、心拍数の著しい低下(diving bradycardia)による分時心拍出量の低下と体内血流分布の再配分³⁶⁻³⁸⁾が注目されている。すなわち、潜水時には腎、消化管、骨格筋等への血流は著明に低下し、心、肺、脳への血流が優先配分される結果となる。特に骨格筋への血流は完全停止の状態になるといわれている。今回見出したアシカの筋における低毛細血管支配は、潜水時に予想される高度な hypoxia という点からみれば、一見矛盾するかにみえるが、当該条件下、筋における血流が事実上杜絶していることからみれば必ずしも不思議ではない。このような阻血状態下、筋運動に要するエネルギーは Mb 結合 O_2 を用いた有 O_2 性代謝に当初は依存するが、やがて無 O_2 性解糖代謝にスイッチされる³⁹⁾。また、代謝 rate も、潜水前のレベルに比し低いレベルで進行するという⁴⁰⁾。

ま と め

6目9種の哺乳動物(ドブネズミ、ヌートリア、ホンダヌキ、ブラックバック、アカカンガルー、ニシクロカンガルー、カリフォルニアアシカ、リスザル、ニシローランドゴリラ)について、総計13種の骨格筋を採取、凍結切片を作製し、amylase-PAS 染色法により毛細血管を染色、mATPase 染色法により筋線維タイプ分けをおこなった。また、分光学的方法により筋ミオグロビン含量(Mb)を測定した。

1. 毛細血管染色結果を教室で開発した解析プログラ

ムにより画像解析し、各毛細血管に関する拡散支配領域の大きさ(capillary domain area, CDA)および筋線維断面面積(FA)を算出した。さらに、CDA から Krogh 拡散円柱の半径推定値(R_K)を計算した。

2. 平均 CDA 値および R_K 値は、ブラックバック横隔膜におけるそれぞれ $658.5 \mu m^2$ および $14.3 \mu m$ から、ゴリラのヒラメ筋における $6076.8 \mu m^2$ および $42.8 \mu m$ と大きな種差を示した。また、同一種でも筋による差、さらに同一筋内でも部域による差を示した。

3. CDA 値(R_K 値)と FA および Mb 値との間には、高い正相関関係が、oxidative な筋線維%((I + II A)%)との間には弱い逆相関関係がそれぞれみられた。この事実は、骨格筋における毛細血管分布を規定する主要因が筋線維のサイズであって、筋線維の代謝特性の関与は、あるとしてもさほど強くないことを示唆する。

4. アシカの骨格筋においては、他の動物種筋の3~15倍に達する高 Mb と1/2~1/3程度の低い毛細血管分布という際立った二つの特徴を示した。前者は筋における O_2 貯蔵量の増加、後者は潜水時における体内血流の再配分(筋における高度阻血と心、脳への優先血流)に対応し、当該動物の優れた潜水機能と密接に関係するものと思われる。

5. アシカの咬筋は、おそらくその食性に関連して、この動物にあっては例外的に低い Mb (8 mg/g) を示した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲いただきました榎 泰義教授に深甚の謝意を表します。なお、画像解析プログラムの開発にあたり、種々御助言いただいた、本学数学教室高橋賢博教授に深謝いたします。また、データの解析に御助力いただきました柴田勝代、石立裕美の両氏に深謝いたしますとともに、ご支援を賜りました教室諸兄姉に厚くお礼申し上げます。

本論文の一部は、第70回日本生理学会大会(1993年4月、山梨)において発表した。

文 献

- 1) Krogh, A. : J. Physiol. 52 : 409-415, 1919.
- 2) Krogh, A. : J. Physiol. 52 : 457-474, 1919.
- 3) Anderson, P. : Acta Physiol. Scand. 95 : 203-205, 1975.
- 4) Brown, M. D., Cotter, M. A., Hudlická, O. and Vrbořa, G. : Pflügers Arch. 361 : 241-250, 1976.
- 5) Schmidt-Nielsen, K. and Pennycuik, P. : Am. J.

- Physiol. **200** : 746-750, 1961.
- 6) **Hoppeler, H., Mathieu, O., Weibel, E. R., Krauer, R., Lindstedt, S. L. and Taylor, C. R.** : Resp. Physiol. **44** : 129-150, 1981.
 - 7) **Weibel, E. R.** : The Pathway for Oxygen. Harvard University Press, Cambridge, London, p175-210, 1984.
 - 8) **Turek, Z., Hoofd, L. and Rakusan, K.** : Adv. Exp. Biol. Med. **215** : 13-19, 1987.
 - 9) **Kayar, S. R., Archer, P. G., Lechner, A. J. and Banchemo, N.** : Microvasc. Res. **24** : 326-341, 1981.
 - 10) **Hoofd, L., Turek, Z., Kubat, K., Ringnald, B. E. M. and Kazda, S.** : Adv. Exp. Med. Biol. **191** : 239-247, 1985.
 - 11) **Egginton, S., Turek, Z. and Hoofd, L.** : Adv. Exp. Med. Biol. **215** : 1-12, 1987.
 - 12) **Davies, A. S. and Gunn, H. M.** : J. Anat. **112** : 41-60, 1972.
 - 13) **Brooke, M. H. and Kaiser, K. K.** : J. Histochem. Cytochem. **18** : 670-672, 1970.
 - 14) **鈴木 惇, 玉手英夫** : 獣医学 1985(伊沢久夫, 清水悠紀臣 他, 編集). 近代出版, 東京, pl-27, 1985.
 - 15) **Suzuki, A. and Tamate, H.** : Acta Histochem. Cytochem. **12** : 69-74, 1979.
 - 16) **Weber, R. E., Johansen, K. and Abe, A. S.** : Comp. Biochem. Physiol. **68A** : 159-165, 1981.
 - 17) **Rome, L. C., Funke, R. P., Alexander, R. M., Lutz, G., Aldridge, H., Scott, F. and Freadman, M.** : Nature **335** : 824-827, 1988.
 - 18) **Romanul, F. C. A.** : Arch. Neurol. **12** : 497-509, 1965.
 - 19) **Sieck, G. C., Cheung, T. S. and Blanco, C. E.** : J. Appl. Physiol. **70** : 103-111, 1991.
 - 20) **Egginton, S., Turek, Z. and Hoofd, L. J. C.** : Resp. Physiol. **74** : 383-396, 1988.
 - 21) 日本動物園水族館協会運営委員会教育指導部 : 飼育ハンドブック—資料編. 日本動物園水族館協会, 東京, p5-192, 1980.
 - 22) **Nemeth, P. and Pette, D.** : J. Physiol. **320** : 73-80, 1981.
 - 23) **Reynafarje, B.** : J. Lab. Clin. Med. **61** : 138-145, 1963.
 - 24) **Enoki, Y., Morimoto, T., Nakatani, A., Sakata, S., Ohga, Y., Kohzuki, H. and Shimizu, S.** : Adv. Exp. Med. Biol. **222** : 709-716, 1988.
 - 25) **市原清志** : バイオサイエンスの統計学. 南江堂, 東京, pp71-114, 203-259, 1994.
 - 26) **加藤嘉太郎** : 家畜比較解剖図説・上巻. 養賢堂, 東京, p156-157, 1975.
 - 27) **Egginton, S.** : Morphometric analysis of tissue capillary supply. in Advances in comparative and environmental physiology 6. Vertebrate gas exchange from environment to cell. Springer, Berlin, p73-141, 1990.
 - 28) **Kreuzer, F.** : Experientia **38** : 1415-1426, 1982.
 - 29) **Egginton, S. and Ross, H. F.** : Planar analysis of tissue capillary supply. in Oxygen transport in biological systems-Modelling of pathways from environment to cell(Egginton, S. and Ross, H. F., eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p165-195, 1992.
 - 30) **Mathieu-Costello, O.** : Annu. Rev. Physiol. **55** : 503-525, 1993.
 - 31) **Braendgaard, H. and Gundersen, H. J. G.** : J. Neurosci. Methods **18** : 39-78, 1986.
 - 32) **Gayeski, T. E. J. and Honig, C. R.** : Am. J. Physiol. **251** : H 789-H 799, 1986.
 - 33) **Burke, R. E.** : Motor units : anatomy, physiology and functional organization. in Handbook of Physiology(Brookhart, J. M., Mountcastle, V. B., Brooks, V. B. and Geiger, S. R., eds.). section 1, Vol. 2, American Physiological Society, Bethesda, p345-422, 1981.
 - 34) **King, J. E.** : Seals of the world. 2nd ed., Oxford University Press, London, p198-201, 1983.
 - 35) **Butler, P. J. and Jones, D. R.** : Adv. Comp. Physiol. Biochem. **8** : 179-364, 1982.
 - 36) **Dejours, P.** : Principles of Comparative Respiratory Physiology(Second revised edition), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p119-145, 1981.
 - 37) **Blix, A. S., Kjekshus J. K., Enge, I. and Bergan, A.** : Acta Physiol. Scand. **96** : 277-280, 1976.
 - 38) **Dormer, K. J., Denn, M. J. and Stone, H. L.** : Comp. Biochem. Physiol. **58A** : 11-18, 1977.
 - 39) **Hochachka, P. W. and Storey, K. B.** : Science **187** : 613-621, 1975.
 - 40) **Scholander, P. F., Irving, L. and Grinnell, S. W.** : J. Biol. Chem. **142** : 431-440, 1942.